

· 基础研究 ·

卵巢癌组织内源性肽 P1DA 促进卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用研究

刘丝雨,王煦苏,徐娟,黄可,贾雪梅*

南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)妇产科,江苏 南京 210004

[摘要] 目的:探讨卵巢组织中来源于 AHNK2 蛋白的多肽(peptide 1 derived from AHNK2 protein, P1DA)对卵巢癌细胞系 SKOV3、OVCAR3 增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。方法:P1DA 处理对数生长期的 SKOV3 和 OVCAR3 细胞后, CCK-8 法检测细胞活性变化,以探索 P1DA 对卵巢癌 SKOV3 和 OVCAR3 细胞增殖的影响; Transwell 实验检测 P1DA 处理后细胞迁移、侵袭能力变化; 流式细胞术检测 P1DA 处理后细胞凋亡率变化,分析 P1DA 对两种卵巢癌细胞凋亡率的影响。结果:P1DA 处理后,卵巢癌细胞 SKOV3 及 OVCAR3 的细胞活性明显增加,迁移、侵袭能力明显增加,细胞凋亡率则无明显变化。结论:卵巢组织内源性肽 P1DA 可促进卵巢癌 SKOV3 及 OVCAR3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,对其凋亡无显著影响。

[关键词] 卵巢癌;内源性多肽;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)09-1314-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20190910

Effects of endogenous peptide P1DA on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells

Liu Siyu, Wang Xusu, Xu Juan, Huang Ke, Jia Xuemei*

Department of Gynecology, Women's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University(Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital), Nanjing 210004, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of ovarian tissue endogenous peptide 1 derived from AHNK2 protein (P1DA) on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of ovarian cancer cell lines of SKOV3 and OVCAR3. **Methods:** SKOV3 and OVCAR3 cells in logarithmic growth phase were treated with P1DA. The cell activity was detected by CCK-8 assay to explore the effect of P1DA on the proliferation of SKOV3 and OVCAR3 cells. Transwell experiment was performed to detect the migration and invasion of SKOV3 and OVCAR3 cells treated with P1DA. Flow cytometry analysis was performed to analyze the apoptosis of SKOV3 and OVCAR3 cells treated with P1DA. And the effects of P1DA on apoptosis of ovarian cancer cells were analyzed. **Results:** The cell activity of SKOV3 and OVCAR3 cells treated with P1DA was significantly increased, the migrated and invaded cells in chamber were increased, and no difference was found in apoptosis of cells after treated with P1DA. **Conclusion:** Ovarian tissue endogenous peptide P1DA can promote the proliferation, migration and invasion of SKOV3 and OVCAR3, but has no effect on cell apoptosis.

[Key words] ovarian cancer; endogenous peptide; proliferation; migration; invasion

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1314-1317, 1335]

据最新研究报道,全球卵巢癌的5年生存率为

46%左右^[1],是死亡率最高的妇科恶性肿瘤,严重威胁女性生命。目前肿瘤细胞减灭术辅以化疗是卵巢癌的主要治疗手段,但由于多数患者被诊断时已是晚期,手术治愈机会渺茫,因此以铂类为基础、联合紫杉醇化疗成为卵巢癌患者重要的治疗手段。

[基金项目] 国家自然科学基金(81872126);江苏省研究生科研创新计划(JX22013446, JX22013553)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xmjia@njmu.edu.cn

大部分卵巢癌患者在初始化疗时对化疗敏感,短期内尚可获得较高缓解率,但往往迅速出现腹部或盆腔复发,并进一步发展为耐药,这是卵巢癌患者生存率一直徘徊在20%~40%的重要原因^[2]。2018年Lancet上肿瘤数据分析也显示,中国卵巢癌患者的5年生存率10年来几乎没有明显变化^[3]。因此,深入研究卵巢癌转移机制,依然是提高卵巢癌生存率的关键问题。

越来越多的研究发现,来源于内源性蛋白水解,或由非编码RNA编码的内源性肽,是生物过程的重要调节因子^[4-8]。多肽组学分析发现,不同生理条件下多肽谱具有明显差异,而其中差异表达多肽可能具有潜在生物活性。例如,异位子宫内膜组织中丰度较高的肽——血管细胞黏附分子-1来源肽可以通过降低E-cadherin的表达,促进子宫内膜间质细胞的迁移和侵袭^[9]。此外,相关研究还发现了多种从母乳中提取的功能肽,包括抗菌肽、免疫调节肽和抗动脉功能障碍肽^[10]。这些结果进一步证实了体内活性多肽的存在。

本课题组前期通过液相色谱/质谱分析了人浆液性卵巢癌组织和正常卵巢上皮组织的多肽组,并通过生物信息学分析发现,在卵巢癌组织中丰度较高、而在正常卵巢上皮组织中未检测到的来源于AHNK2蛋白的多肽(peptide 1 derived from AHNK2 protein,P1DA)具有潜在的免疫调节能力^[11],可能在肿瘤的发生、发展中发挥作用。因此,我们在卵巢癌细胞系中验证了PD1A在卵巢癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移中的作用,并发现多肽PD1A可以显著促进卵巢癌细胞的增殖、侵袭和转移,而不影响卵巢癌细胞的凋亡。

1 材料和方法

1.1 材料

卵巢癌细胞系SKOV3和OVCAR3购自中国科学院细胞库。不完全McCoy's 5A及DMEM购于凯基生物。SKOV3细胞的培养基为McCoy's 5A加10%FBS,OVCAR3细胞的培养基为DMEM加10%FBS,细胞培养于37℃、5%CO₂的培养箱中。多肽由上海科肽生物科技有限公司合成,纯度>95%,溶解于无菌水中,终浓度为20 mmol/L,保存于-40℃,直至使用。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖试验

将悬浮于100 μmol/L P1DA新鲜培养基及对照

溶剂中的细胞按照1 000个/孔的密度接种于96孔板中。分别在0、24、48、72 h时更换为含10%(V/V)CCK-8试剂的新鲜培养基。加入CCK-8试剂后2 h,利用微板阅读器测定吸光度,波长450 nm。含有100 μmol/L P1DA的培养液每24 h更换1次。

1.2.2 细胞迁移、侵袭实验

将孔径为8.0 μm(Corning公司,美国)的聚碳酸酯细胞培养小室放入到对应的24孔板中。将200 μL含有5×10⁴个细胞和100 μmol/L P1DA的无血清培养基及200 μL含有5×10⁴个细胞和对照溶剂的无血清培养基,接种于含或不含Matrigel(BD Science公司,美国)的聚碳酸酯细胞培养小室的上腔室,将含20%FBS的700 μL新鲜培养基添加到下腔室内。根据不同细胞的迁移与侵袭能力选择最佳的检测时间。迁移实验:OVCAR3细胞培养48 h,SKOV3细胞培养24 h。侵袭实验:SKOV3培养48 h,OVCAR3细胞培养72 h。小室取出后,用4%多聚甲醛固定1 h,0.1%结晶紫染色30 min,PBS洗涤2次,最后用棉签去除上腔内的细胞后,加入200 μL裂解缓冲液(Invitrogen公司,美国)裂解下腔中的结晶紫染色细胞,并在微平板阅读器(BioTek Synergy H4)中测定吸光度值,波长为575 nm。

1.2.3 细胞凋亡实验

SKOV3及OVCAR3在100 μmol/L P1DA作用24 h后,用不含EDTA的胰蛋白酶消化液室温消化2~3 min,然后按照PE-Annexin V细胞凋亡检测试剂盒(BD Biosciences公司,美国)操作说明对多肽处理的细胞与溶剂处理的对照组细胞进行PE和Annexin V染色(20 min)。染色后的细胞用流式细胞仪(Beckman公司,美国)进行检测和分析。

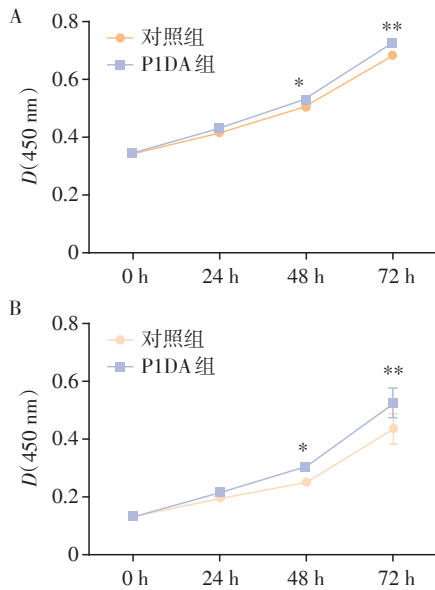
1.3 统计学方法

所有数据均用SPSS 17.0进行统计学分析。细胞实验数据均以3次实验的平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用Student's *t*-test检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P1DA可以显著促进卵巢癌细胞的增殖

将100 μmol/L P1DA加入到处于对数生长期的SKOV3及OVCAR3细胞培养液中作用24、48、72 h,CCK8试剂盒检测细胞活性(图1),结果显示,100 μmol/L P1DA处理SKOV3及OVCAR3细胞48、72 h后,与对溶剂处理的对照组比较,吸光度值差异具有统计学意义,并且随着时间推移,差异逐渐增



A: P1DA 处理对 SKOV3 细胞增殖的影响; B: P1DA 处理对 OVCAR3 细胞增殖的影响。与溶剂处理对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 P1DA 对卵巢癌 SKOV3 及 OVCAR3 细胞增殖的影响
Figure 1 The effect of P1DA on the proliferation of SKOV3 and OVCAR3 cells

大。提示 P1DA 处理 48 h 后, 卵巢癌细胞 SKOV3 及

OVCAR3 的增殖显著增加。

2.2 P1DA 可以显著增强卵巢癌细胞 SKOV3 及 OVCAR3 的侵袭和迁移能力

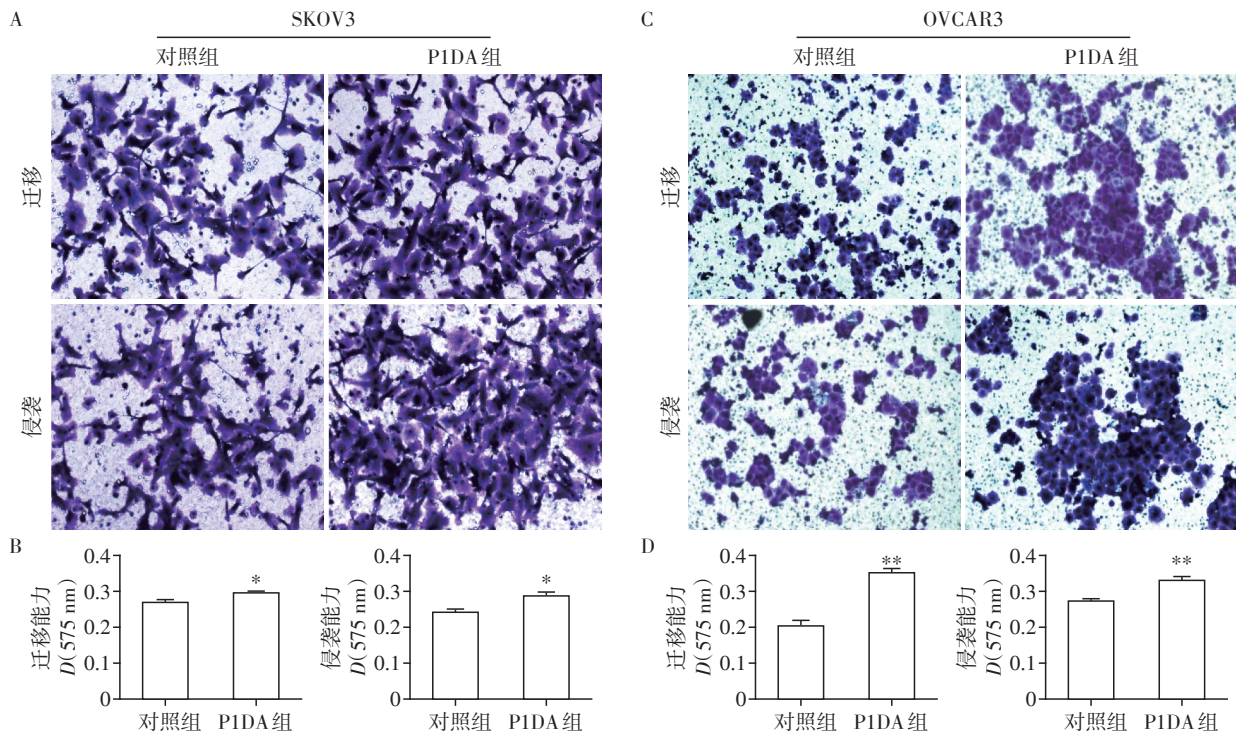
将 5×10^4 个细胞接种于含或不含 Matrigel 的上腔室, 检测细胞侵袭和迁移能力(图2)。结果显示, 100 $\mu\text{mol/L}$ P1DA 处理的 SKOV3 及 OVCAR3 细胞相较于溶剂处理的对照组, 有更强的迁移及侵袭能力。提示 P1DA 可以促进卵巢癌细胞 SKOV3 及 OVCAR3 的迁移与侵袭能力。

2.3 P1DA 对卵巢癌细胞 SKOV3 及 OVCAR3 的凋亡没有显著影响

为研究 P1DA 对卵巢癌细胞 SKOV3 及 OVCAR3 凋亡能力的影响, 用流式细胞术检测了 100 $\mu\text{mol/L}$ P1DA 处理 24 h 后, SKOV3 及 OVCAR3 细胞与溶剂处理对照组细胞的凋亡率(图3)。与对照组相比, P1DA 处理的 SKOV3 及 OVCAR3 细胞凋亡率并无明显变化, 提示 P1DA 对卵巢癌细胞 SKOV3 及 OVCAR3 的凋亡无明显影响。

3 讨论

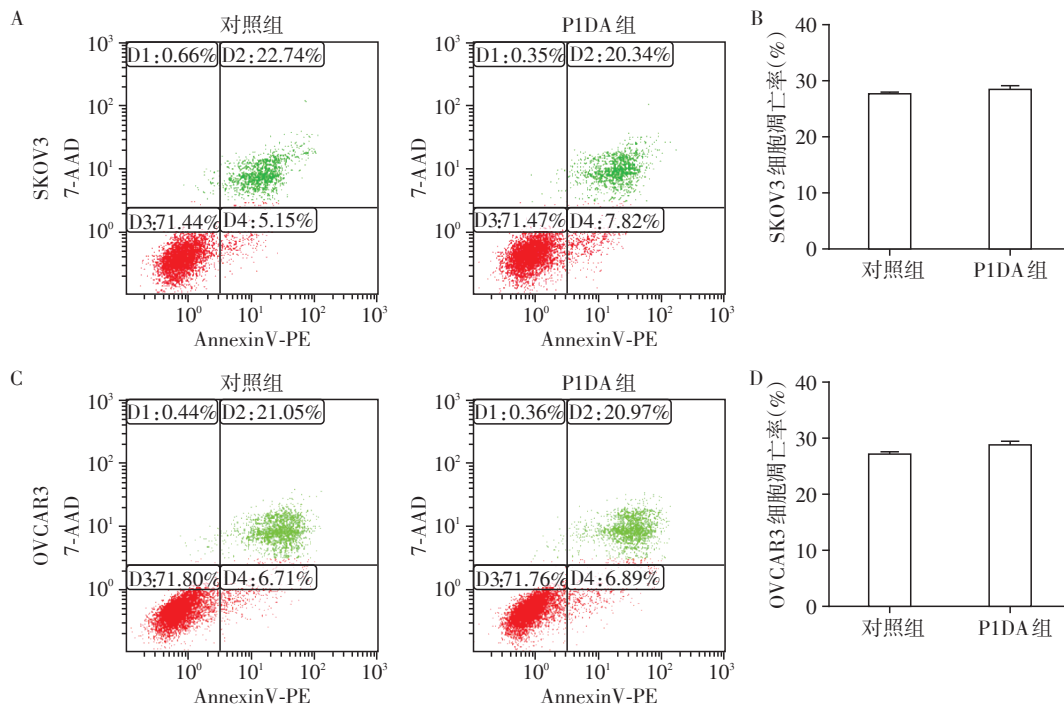
近年来, 随着研究的不断深入, 越来越多的活



A: 倒置显微镜下观察 SKOV3 细胞的迁移和侵袭能力(结晶紫染色, $\times 200$); B: 定量分析 SKOV3 细胞的迁移和侵袭能力; C: 倒置显微镜下观察 OVCAR3 细胞的迁移和侵袭能力(结晶紫染色, $\times 200$); D: 定量分析 OVCAR3 细胞的迁移和侵袭能力。与对照组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。

图2 P1DA 对卵巢癌 SKOV3 及 OVCAR3 细胞迁移、侵袭的影响

Figure 2 The effect of P1DA on the migration and invasion of SKOV3 and OVCAR3 cells



A: 流式细胞仪检测 PIDA 组与对照组 SKOV3 细胞凋亡情况; B: 定量分析 SKOV3 细胞凋亡率; C: 流式细胞仪检测 PIDA 组与对照组 OVCAR3 细胞凋亡情况; D: 定量分析 OVCAR3 细胞凋亡率。

图3 PIDA对卵巢癌细胞SKOV3及OVCAR3凋亡的影响

Figure 3 The effect of PIDA on the apoptosis of SKOV3 and OVCAR3 cells

性肽被发现,如药物敏感肿瘤细胞释放的可以杀死耐药性肿瘤细胞的肽,以及可作为抗癌疫苗使用的抗原肽等^[7,12]。

目前机体本身存在的内源性多肽的功能研究还较少,现有研究发现肌肉收缩诱导的内源性肽 apelin 可增强肌纤维中的肌肉功能,增强肌肉再生能力^[13];胰腺分泌的胰腺多肽可以预测内脏和肝脏脂肪含量等^[14]。随着多肽组学的不断发展,越来越多的研究发现机体在不同生理状态下有不同的多肽谱,以及在正常状态和疾病状态下差异表达多肽的功能等^[15-16]。

然而由于正常组织中丰度较高的多肽可以直接作为小分子药物用于疾病的治疗和预防^[17-20],因此前期研究主要集中在正常组织中丰度较高的多肽,几乎很少有人关注疾病状态下多肽的功能研究。本课题组前期对卵巢癌组织及正常卵巢上皮组织差异性多肽谱的研究发现,在卵巢癌组织中丰度显著提高的多肽数量是正常组织中丰度较高多肽数量的4倍多(卵巢癌组织高表达508条,正常卵巢上皮组织高表达126条)^[11],这些结果提示卵巢癌组织可能可以通过释放多肽来促进肿瘤的生长和转移等。

本研究首次通过细胞实验验证了卵巢癌组织特异性的多肽PIDA可以显著增强卵巢癌细胞

SKOV3及OVCAR3的增殖、迁移和侵袭能力,但对卵巢癌细胞凋亡没有明显影响。这些结果表明,肿瘤组织中的确存在可以促进肿瘤增殖、侵袭和转移作用的多肽,这可能是肿瘤组织维持和促进自身生长及功能的另外一条重要机制。

【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30
- [2] Smith RA, Andrews KS, Brooks D, et al. Cancer screening in the United States, 2017: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(2): 100-121
- [3] Ueda T, Maehara M, Takahashi Y, et al. Clinical significance of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy for advanced and recurrent gynecological cancer [J]. Anticancer Res, 2012, 32(6, SI): 2353-2357
- [4] Laressergues D, Couzigou JM, Clemente HS, et al. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides [J]. Nature, 2015, 520(7545): 90-93
- [5] Szafron LM, Balcerak A, Grzybowska EA, et al. The novel gene CRNDE encodes a nuclear peptide (CRNDEP) which is overexpressed in highly proliferating tissues [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127475

(下转第1335页)

- the levonorgestrel-releasing intrauterine system[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2018, 83(6):569-575
- [13] Arnes M, Hvingel B, Orbo A. Levonorgestrel-impregnated intrauterine device reduces occurrence of hyperplastic polyps: a population-based follow-up cohort study [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(5):2319-2324
- [14] 李建霞,孙彩芹.宫腔镜电切术联合左炔诺孕酮宫内缓释系统治疗子宫内膜息肉的临床疗效分析[J].*现代妇产科进展*, 2016, 25(7):529-531
- [15] 李 瑜,滕 芳,傅士龙,等.左炔诺孕酮宫内缓释系统治疗子宫内膜癌1例[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(5):728-730
- [16] Zhang Q, Qi GH, Kanis MJ, et al. Comparison among fertility-sparing therapies for well differentiated early-stage endometrial carcinoma and complex atypical hyperplasia [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34):57642-57653
- [17] 朱兰芬,张仕铜.运用微信对曼月乐环放置者行延续护理管理的效果[J].*中医药管理杂志*, 2016, 24(21):44-46
- [18] Zhao S, Deng J, Wang Y, et al. Experience and levels of satisfaction with the levonorgestrel-releasing intrauterine system in China: a prospective multicenter survey [J]. *Patient Prefer Adherence*, 2014, 8:1449-1455
- [19] 陈 琳.曼月乐联合 GnRH- α 、口服避孕药治疗子宫腺肌症的临床疗效观察[D].*郑州:郑州大学*, 2014
- [20] 常 青,杨合荣,王 江,等.人工流产后即时放置左炔诺孕酮宫内缓释系统的临床观察[J].*中华妇产科杂志*, 2008, 43(5):385-387
- [21] Korjamo R, Mentula M, Heikinheimo O. Expulsions and adverse events following immediate and later insertion of a levonorgestrel-releasing intrauterine system after medical termination of late first- and second-trimester pregnancy: a randomised controlled trial [J]. *BJOG*, 2017, 124(13):1965-1972
- [收稿日期] 2019-01-04

(上接第 1317 页)

- [6] Matsumoto A, Pasut A, Matsumoto MA, et al. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide[J]. *Nature*, 2017, 541(7636):228
- [7] Hebbar N, Burikhanov R, Shukla N, et al. A naturally generated decoy of the prostate apoptosis response-4 protein overcomes therapy resistance in tumors [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15):4039-4050
- [8] Kulhari H, Pooja D, Kota R, et al. Cyclic RGDfK peptide functionalized polymeric nanocarriers for targeting gemcitabine to ovarian cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(5):1491-1500
- [9] Xue Y, Xu PF, Xu SJ, et al. Peptidomic analysis of endometrial tissue from patients with ovarian endometriosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(1):107-118
- [10] Picariello G, Addeo F, Ferranti PA, et al. Antibody-independent identification of bovine milk-derived peptides in breast-milk [J]. *Food Funct*, 2016, 7(8):3402-3409
- [11] Xu J, Wang X, Xu P, et al. Mass spectrometry-based peptidome profiling of human serous ovarian cancer tissues [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 107:53-61
- [12] Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi EA, et al. Association between high-avidity T-cell receptors, induced by alpha-fetoprotein-derived peptides, and anti-tumor effects in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(6):1395
- [13] Vinel C, Lukjanenko L, Batut A, et al. The exerkin peptide reverses age-associated sarcopenia [J]. *Nat Med*, 2018, 24(9):1360
- [14] Sam AH, Sleeth ML, Thomas EL, et al. Circulating pancreatic polypeptide concentrations predict visceral and liver fat content [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(3):1048-1052
- [15] Kersten RD, Yang YL, Xu Y, et al. A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(11):794-802
- [16] Wang L, Tang C, Xu B, et al. Mass spectrometry-based serum peptidome profiling accurately and reliably predicts outcomes of pemetrexed plus platinum chemotherapy in patients with advanced lung adenocarcinoma [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0179000
- [17] 夏文晋,喻荣彬,姜柏生,等.脾多肽联合同步放疗治疗局限期小细胞肺癌的临床观察[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(3):356-359
- [18] Wang SM, Blois A, El Rayes T, et al. Development of a prosaposin-derived therapeutic cyclic peptide that targets ovarian cancer via the tumor microenvironment [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(329):329-334
- [19] Wang HM, Feng ZQ, Xu B. D-amino acid-containing supramolecular nanofibers for potential cancer therapeutics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 110:102-111
- [20] Cui HG, Chen XY. Peptides and peptide conjugates in medicine preface [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 110:1-2
- [收稿日期] 2019-01-08